

A5  
952640  
p#6  
5-24-93


**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> : <p style="text-align: center;"><b>C12N 5/24, A61K 39/395</b></p>	<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 91/00342</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>10. Januar 1991 (10.01.91)</b>
---	-----------	---

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP90/00976**

(22) Internationales Anmeldedatum: **20. Juni 1990 (20.06.90)**

(30) Prioritätsdaten:  
**P.39 21 211.4      28. Juni 1989 (28.06.89)      DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): **IDT AG FÜR IN VIVO DIAGNOSTIK UND THERAPIE [CH/CH]; Lagerstr. 107, CH-8001 Zürich (CH).**

(72) Erfinder; und  
 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WATZEK, Carl [DE/DE]; Wichernstr. 11, D-8120 Weilheim (DE). PRIDUN, Nestor [AT/AT]; Slattingasse 2, A-1103 Wien (AT).**

(74) Anwalt: **DEUFEL-SCHÖN-HERTEL-LEWALD; Isartorplatz 6, D-8000 München 2 (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten: **AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent)\*, DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.**

**Veröffentlicht**  
*Mit internationalem Recherchenbericht.*

**(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES**

**(54) Bezeichnung: HERSTELLUNGSVERFAHREN FÜR HUMANE MONOKLONALE ANTIKÖRPER**

**(57) Abstract**

The process of the invention comprises the following steps: (a) isolation and preparation of cells exhibiting antigens, T<sub>H</sub> and B cell precursors from tumour-infiltrated people, those infected with procaryotic or eucaryotic excitors, especially viruses, or those with a hereditary disease; (b) activation of the T<sub>H</sub> and B cell precursors of (a) by boodiog to the cells of (a) exhibiting antigens; (c) isolation and preparation of B cells from tumour-infiltrated people, those infected with procaryotic or eucaryotic excitors, especially viruses, those with a serious disease or healthy people; (d) activating the B cells of (c) by bonding to the antigen-activated T<sub>H</sub> and B cell precursors of (b), and (e) cloning the activated B cells of (d).

**(57) Zusammenfassung**

Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt folgende Verfahrensschritte: (a) Isolierung und Aufbereitung von antigenpräsentierenden Zellen, T<sub>H</sub>-Zellvorläufern und B-Zellvorläufern aus tumorinfiltrierten, mit prokaryotischen oder eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren, infizierten oder eine erbliche Krankheit aufweisenden Persooen; (b) Aktivierung der T<sub>H</sub>-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer von (a) durch Anbindung an die antigenpräsentierenden Zelleo von (a); (c) Isolierung und Aufbereitung von B-Zellen aus tumorinfiltrierten, mit prokaryontischen oder eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren, infizierten, eine erbliche Krankheit aufweisenden oder gesunden Personen; (d) Aktivierung der B-Zellen von (c) durch Anbindung an die antigenaktivierten T<sub>H</sub>-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer von (b), und (e) Klonierung der aktivierten B-Zellen von (d).

### BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanken
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BJ	Burkina	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IT	Italien	SD	Sudan
CA	Kanada	JP	Japan	SE	Schweden
CF	Zentralafrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MC	Monaco		

HERSTELLUNGSVERFAHREN FÜR HUMANE MONOKLONALE ANTIKÖRPER

- 1 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern und ihre Verwendung.
- 5 Der Nachweis von Tumorantigenen, bakteriellen- oder viralen Antigenen sowie von durch Mutation veränderten humanen Proteinen, die im Serum, im Urin oder in Geweben des Menschen in extrem niedrigen Konzentrationen vorliegen, erfordert Verfahren, die nicht nur sehr sensitiv, sondern
- 10 auch hochspezifisch sind. Üblicherweise werden hierfür Verfahren, wie ein Radioimmunoassay (RIA), Enzymimmunoassay (EIA, ELISA) oder Immunfluoreszenzassay (IFA) verwendet. In ihnen werden Antigene durch ihre spezifischen, indirekt markierten Antiseren nachgewiesen. Monoklonale Antikörper,
- 15 die hier ebenfalls zum Nachweis von Antigenen verwendet werden, werden direkt oder auch indirekt markiert.

Es hat sich nun allerdings gezeigt, daß oftmals aus Tieren gewonnene Antiseren, insbesondere gegen Viren, nicht

20 ausreichend sensitiv sind. Sie weisen dann häufig nur Antikörper gegen einige wenige der viralen Antigene auf. Auch ist es vielfach nur möglich, monoklonale Antikörper gegen einzelne, nicht aber gegen alle Antigene eines Virus aus immunisierten Tieren zu erhalten.

25 Aufgrund solcher Erfahrungen versucht man nun auch Antikörper direkt aus B-Zellen von infizierten oder infiltrierten Personen zu isolieren und zu klonieren. Die Gewinnung solcher humaner monoklonaler Antikörper erweist

30 sich jedoch als äußerst schwierig. Bereits das permanente Inkulturrethalten von humanen B-Zellen verursacht große Probleme. So werden Versuche beschrieben, humane B-Zellen durch Virustransformation zu immortalisieren. Auch werden humane B-Zellen mit Maus-Myelomzellen fusioniert. Bis jetzt

35 erwiesen sich diese Versuche jedoch nicht als geeignet, um

- 1 B-Zellen so zu kultivieren, daß humane monoklonale Antikörper hergestellt werden könnten.

5 Auch führten Versuche, in denen Chromosomen aus von humanen B-Zellen und Maus-Myelomzellen gebildeten Hybridomazellen isoliert und in Mikroorganismen transfiziert wurden, nicht zur gewünschten Expression von humanen monoklonalen Antikörpern.

10 Darüberhinaus ist zu bemerken, daß in Versuchen mit Hybridomazellen generell die Gefahr besteht, daß Chromosomenteile und somit auch Abschnitte von Immunglobulingen verloren gehen. Unspezifisch bindende humane monoklonale Antikörper sind deshalb häufig die Folge.

15 Im weiteren werden Versuche beschrieben, humane Antikörper mit definierten Antigen-Bindungsregionen herzustellen, d.h. Antikörper zu konstruieren, deren konstante und variable Regionen von humanen Antikörpern stammen, während ihre  
20 Antigen-Bindungsregionen genau definiert und mittels Rekombination eingebracht werden. Solche chimären Antikörper finden Anwendung in Patentschriften und relevanten Publikationen über die der Herstellung potentieller AIDS- und Tumor-Therapeutika.

25 Zu bemerken ist allerdings, daß bei der Klonierung von chimären Antikörpern häufig Chromosomenverluste auftreten, so daß auch hier vielfach nur unspezifisch bindende humane monoklonale Antikörper erhalten werden.

30 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, durch das spezifische humane monoklonale Antikörper hergestellt werden können.

35

1 Erfindungsgemäß wird dies in einem Verfahren erreicht, das folgende Verfahrensschritte umfaßt:

- 5 a) Isolierung und Aufbereitung von antigenpräsentierenden Zellen, T-Helfer( $T_H$ )-Zellvorläufern und B-Zellvorläufern aus tumorinfiltrierten, mit prokaryontischen oder eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren, infizierten oder eine erbliche Krankheit aufweisenden Personen,
- 10 b) Aktivierung der  $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer von a) durch Anbindung an die antigenpräsentierenden Zellen von a),
- 15 c) Isolierung und Aufbereitung von B-Zellen aus tumorinfiltrierten, mit prokaryontischen oder eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren, infizierten, eine erbliche Krankheit aufweisenden oder gesunden Personen,
- 20 d) Aktivierung der B-Zellen von c) durch Anbindung an die antigenaktivierten  $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer von b), und
- 25 e) Klonierung der aktivierten B-Zellen von d).

30 Im erfindungsgemäßen Verfahren werden antigenpräsentierende Zellen vorzugsweise aus der Pleuraflüssigkeit der angegebenen Personen isoliert. Dazu wird diese Flüssigkeit mit einem Puffer, vorzugsweise Hanks, verdünnt und zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden dann in Medium, das hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum enthält, aufgenommen und inkubiert.

1 Vorzugsweise enthält das Medium auch Stoffe, durch die  
Zellen zur Proliferation angeregt werden. Als bevorzugte  
Stoffe werden dabei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die aus  
den in der DE-OS 38 11 692 beschriebenen Farbstoffmolekülen  
5 A und B erhalten werden. Unter dem Farbstoffmolekül A  
versteht man das Kondensationsprodukt von Flavoprotein,  
nämlich jenes von Riboflavin-5'-monophosphatnatriumsalz mit  
alpha-Liponsäure, das nach Zugabe von Jodacetamid und  
Dialysieren nach Destillation zurückbleibt. Als  
10 Farbstoffmolekül B versteht man das weitere  
Umsetzungsprodukt des Destillationsrückstandes mit einer  
Reaktionslösung aus  
1,4-Bis(4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol und p-Terphenyl  
in einem organischen Lösungsmittel, dem Maleinsäureanhydrid  
15 zugesetzt ist, und das nach mehrstündigem Stehen auf einen  
neutralen pH-Wert eingestellt und in üblicherweise gereinigt  
ist. Zellen, die die angesprochenen Fluoreszenzfarbstoffe  
aufgenommen haben, erfahren nicht nur eine  
Wachstums-Stimulation, sondern werden auch  
20 fluoreszenzmarkiert und somit unter dem Mikroskop erkennbar.  
Erfindungsgemäß werden die angesprochenen  
Fluoreszenzfarbstoffe bevorzugt gekoppelt, beispielsweise  
mit Proteinen oder Peptiden, eingesetzt. Sie werden dann als  
carriergebundene Fluoreszenzfarbstoffe bezeichnet.  
25  
Zellen, die sich bei der Inkubation mit dem angesprochenen  
Medium nicht festsetzen, werden durch mehrmaliges Waschen  
entfernt und von den adhärennten Zellen werden  
kontaminierende Fibroblasten, Makrophagen und Mesothelzellen  
30 abgetrennt. Aus fluoreszenzmarkierten antigenpräsentierenden  
Einzelzellen werden schließlich Klone herangezogen. Dazu  
wird ein serumfreies, die Proliferation  
antigenpräsentierender Zellen förderndes Medium (nachstehend  
als serumfreies, antigenstimulierendes Medium bezeichnet)  
35 verwendet. Als Medium kann hierfür beispielsweise das

-4a-

1

handelsübliche Basismedium IMDM (Iscoves modified Dulbecco medium) ohne L-Glutamin herangezogen werden. Diesem Medium werden Faktoren wie TCGF (Interleukin 2) und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) zugegeben.

5

10

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden  $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer vorzugsweise aus Venenblut der angegebenen Personen isoliert. Die Zellen werden dabei durch mehrere zentrifugationsschritte gesammelt und auf mit Blutgruppenserum und GM-CSF (vorstehend angegeben)

15

20

25

30

35

1 beschichteten Petrischalen ausplattiert. Nicht-adhärente  
Zellen werden ausgewaschen, während die festsitzenden Zellen  
in serumfreiem, antigenstimulierenden Medium (vorstehend  
angegeben) resuspendiert und aufbewahrt werden.

5

Die  $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer werden durch  
Anbindung an die antigenpräsentierenden Zellen aktiviert.  
Die Aktivierung verläuft in drei Phasen. Nach der Anbindung  
der  $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer an die  
10 antigenpräsentierenden Zellen wird IL-1 (Interleukin 1)  
gebildet. Dies führt zusammen mit der Stimulierung durch das  
Antigen zur Ausbildung von IL-2 Rezeptoren auf den  
 $T_H$ -Zellvorläufern.  $T_H$ -Zellvorläufer werden zur  
Freisetzung von IL-2 angeregt, wodurch die Proliferation der  
15 antigenaktivierten B-Zellvorläufer induziert wird.

Erfindungsgemäß werden  $T_H$ -Zellvorläufer und  
B-Zellvorläufer vorsichtig mit fluoreszenzmarkierten  
antigenpräsentierenden Zellen gemischt und inkubiert.  
20 Nicht-adhärente Zellen werden ausgewaschen, während die  
festsitzenden Zellen in serumfreies, die Proliferation  
antigenpräsentierender Zellen nicht-förderndes Medium  
(nachstehend als serumfreies, nicht-antigenstimulierendes  
Medium bezeichnet) überführt und in diesem inkubiert werden.  
25 Als Medium kann beispielsweise das handelsübliche  
Basismedium IMDM (Iscoves modified Dulbecco medium) ohne  
L-Glutamin verwendet werden. Diesem Medium werden Faktoren  
wie LAF (Interleukin 1), TRF (T-cell replacing factor) und  
GM-CSF (vorstehend angegeben) zugegeben. Unter kurzer  
30 Einwirkung von UV-Licht und der Wegnahme des  $CO_2$ -Druckes  
werden die antigenaktivierten  $T_H$ -Zellvorläufer und  
B-Zellvorläufer von den antigenpräsentierenden Zellen  
abgelöst. Anschließend werden die antigenaktivierten  
Zellvorläufer abzentrifugiert und in serumfreiem,  
35 nicht-antigenstimulierenden Medium (vorstehend angegeben)  
resuspendiert und aufbewahrt.

1 Zur Aktivierung von B-Zellen werden diese an die  
antigenaktivierten  $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer  
angebunden. Die B-Zellen reifen dann zu  
antikörperproduzierenden(-sezernierenden) Zellen  
5 (Plasmazellen) aus. Reife B-Zellen können dabei von unreifen  
B-Zellen durch Inkubation mit einem gegen ihr  
Oberflächenimmunoglobulin gerichteten Antikörper  
unterschieden werden. Reife B-Zellen synthetisieren ihr  
Oberflächenimmunoglobulin innerhalb von 24 h neu, während  
10 unreife B-Zellen dazu nicht in der Lage sind.

Erfindungsgemäß werden B-Zellen vorzugsweise aus Venenblut  
der angegebenen Personen isoliert. Die Zellen werden  
gewaschen, in serumfreiem, nicht-antigenstimulierenden  
15 Medium, dem vorzugsweise zur Proliferations-Stimulierung der  
zellen der vorstehend angegebene Fluoreszenzfarbstoff  
zugegeben wird, inkubiert, anschließend zentrifugiert und  
gewaschen. Die pelletierten Zellen werden erneut in gleichem  
Medium aufgenommen und vorsichtig mit antigenaktivierten  
20  $T_H$ -Zellvorläufern und B-zellvorläufern gemischt und dann  
inkubiert. Durch das Einwirken von UV-Licht und dem  
 $CO_2$ -Druckabfall werden die antigenaktivierten  
Vorläuferzellen abgelöst. Sie werden abzentrifugiert,  
während die festsitzenden aktivierten B-Zellen mehrmals in  
25 Medium gewaschen, zentrifugiert und erneut in Medium  
resuspendiert werden. Die aktivierten B-Zellen werden dann  
in Tüpfel von Mikrotiterplatten eingebracht und inkubiert.  
Die Platten werden zentrifugiert und nachdem Makrophagen und  
restliche Zellvorläufer entfernt sind, werden die  
30 aktivierten B-Zellen nochmals mit dem vorstehend angegebenen  
Fluoreszenzfarbstoff markiert und 8 Tage inkubiert. Alle  
zwei Tage wird die Antikörperproduktion überprüft. Dazu  
werden die Überstände der Tüpfel getestet. B-Zellen, deren  
Überstände positiv sind, werden Freßzellen oder Makrophagen  
35 zugegeben, wodurch die B-Zellen zur Proliferation angeregt  
werden. Nach Ausdifferenzierung zu antikörpersezernierenden

1 Plasmazellen werden diese kloniert. Dazu werden die in den  
positiven Überständen vorliegenden Zellen vereinzelt und  
kultiviert.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht es, humane  
monoklonale Antikörper herzustellen, ohne daß dabei  
Rekombinations- oder Zellfusionsverfahren angewandt werden  
müßten. So können die bei diesen Verfahren oftmals  
eintretenden Chromosomenverluste vermieden werden, wodurch  
10 auch die damit verbundene Gefahr, unspezifisch bindende  
Antikörper zu erhalten, ausgeschlossen werden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist ferner den großen  
Vorteil auf, daß nicht wie üblich Antikörper nur von einer  
15 begrenzten Zahl verschiedener, reifer humaner B-Zellen  
(Plasmazellen) erhalten werden, sondern daß durch die  
Verwendung von  $T_H$ -Zellvorläufern und B-Zellvorläufern noch  
das Gesamt-Potential aller in einer Person möglicher  
Antikörpervariationen ausgenutzt werden kann. Die  
20 Möglichkeit verschiedenste Antikörper zu erhalten, ist damit  
gegeben. So gelang es beispielsweise auch Antikörper gegen  
das HIV-Oberflächenprotein gp 120 und seinen Vorläufer gp  
160 zu isolieren.

25 Erfindungsgemäß hergestellte humane monoklonale Antikörper  
besitzen wie bereits angesprochen die Fähigkeit, spezifisch  
zu binden. Sie eignen sich also zum Nachweis ganz spezieller  
Antigene und damit zur Diagnose von Tumor-, erblichen oder  
durch prokaryontische oder eukaryontische Erreger,  
30 insbesondere Viren, hervorgerufenen Erkrankungen. Als virale  
Erkrankungen sind dabei besonders AIDS, Multiple Sklerose  
und Alzheimerische Krankheit gemeint, während als  
Tumorerkrankung insbesondere das Kleinzellen-Lungenkarzinom  
angesprochen ist.

35

- 1 Erfindungsgemäß hergestellte humane monoklonale Antikörper  
eigenen sich darüberhinaus auch für therapeutische  
Maßnahmen, da aufgrund fehlender wirtsfremder Determinanten  
in behandelten Patienten keine gegen die erfindungsgemäß  
5 hergestellten Antikörper gerichtete Antikörperproduktion  
stattfindet.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

10

Beispiel 1

Herstellung eines Fluoreszenzfarbstoffes.

- 15 Die kristallinen Farbstoffmoleküle A und B gemäß DE-OS 38 11  
692 (Seite 2 und Anspruch 1) werden getrennt in PBS Puffer  
im Ultraschallbad bis zur klaren Lösung behandelt. Je 4 mmol  
der Farbstoffmoleküle A und B werden in  
100 ml einer 0,1 N HCl unter tropfenweiser Zugabe einer  
20 1%igen  $\text{NaNO}_2$ -Lösung unter ständigem Rühren bei 4°C  
diazotiert.

- Zur Vermeidung eines Überschusses von  $\text{HNO}_2$  wird das  
Reaktionsgemisch mit Stärke-Jodid-Teststreifen kontrolliert.  
25 Liegt freies  $\text{HNO}_2$  vor, zeigt der Teststreifen eine  
blau-schwarze Färbung.

- Nach Beendigung der Reaktion wird das Farbstoff-Konjugat 1 h  
bei 4°C dialysiert und steril filtriert.

30

Der gebrauchsfertige Fluoreszenzfarbstoff wird auf pH -7,5  
eingestellt und im Kühlschrank aufbewahrt.

35

1     Beispiel 2

Herstellung von carriergebundenem Fluoreszenzfarbstoff.

5     Durch Kopplung des gebrauchsfertigen Fluoreszenzfarbstoffes von Beispiel 1 mit Proteinen, Peptiden oder anderen Substanzen wird ein carriergebundener Fluoreszenzfarbstoff erhalten.

10    Die Kopplungsreaktion wird bei 4°C und einem pH-Wert von 9,0 durchgeführt.

Von einem Protein mit einem Molekulargewicht von 155.000 (IgG) werden 0,08 mmol zur Kopplung benötigt. Diese Proteinmenge wird in 100 ml Borat-Puffer, oder als  
15    Alternative in Carbonat-Puffer, pH -9,0 unter leichtem Rühren gelöst und der gebrauchsfertige Fluoreszenzfarbstoff von Beispiel 1 langsam unter ständiger pH-Kontrolle und leichtem Rühren an der Innenwand des Reaktionsgefäßes ablaufend der Proteinklösung zugegeben. Nach beendeter Zugabe  
20    wird die Reaktionslösung 2 h bei 4°C unter häufiger pH-Kontrolle gerührt. Über Nacht wird die Reaktionslösung im Kühlschrank stengelassen und danach 12 h gegen 5 - 7 L 0,15 M NaCl dialysiert. Nach Abschluß der Dialyse wird der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

25    Die Kopplung kann alternativ auch mittels einer Gleichgewichtsdialyse vorgenommen werden. Zwei Dialysekammern mit unterschiedlichen Membranen werden mit einem dazwischenliegenden Membranfilter zusammengefügt und  
30    luftdicht verschlossen.

In die Kammer, deren Membran, die Diffusion des gebrauchsfertigen Fluoreszenzfarbstoffes, nicht aber die des

-10-

1 Proteins oder Peptides erlaubt, wird die Proteinlösung  
eingebracht, in die andere Kammer der gebrauchsfertige  
Fluoreszenzfarbstoff.

5 Das Gleichgewicht ist erreicht, wenn die Konzentration des  
freien Proteins auf beiden Seiten gleich ist. Die Messung  
von freiem und gebundenem Protein erfolgt im Fluorometer.  
Die Absorptions- und Emissionsspektren zeigen freie und  
gebundene Proteinmengen auf.

0 Hyaluronidase (MG 89.000) stellt einen wichtigen  
Diffusionsfaktor zum Einbau von Proteinen, Peptiden und  
anderen Substanzen in lebende Zellen dar.  
In 100 ml gebrauchsfertigen Fluoreszenzfarbstoff von  
5 Beispiel 1 wird 1 ml gelöste Hyaluronidase (in 0.9 % NaCl)  
pipettiert. Dann wird das Reaktionsgemisch 10 min bei 37°C  
stark gerührt, auf 4°C abgekühlt, dialysiert und auf pH 7,5  
eingestellt. Für den Zelleinbau werden bestimmte Proteine,  
Peptide oder andere Substanzen mit dem gebrauchsfertigen  
0 Fluoreszenzfarbstoff von Beispiel 1 gekoppelt. Die  
Einführung in die Zellen erfolgt nach den  
Anwendungsvorschriften "Gen Pulser<sup>TM</sup>-Transfektionsgerät,  
Bio-Rad-Lab., Richmond, CA., USA.

15

### Beispiel 3

Isolierung und Aufbereitung antigenpräsentierender Zellen  
aus humaner Pleuraflüssigkeit.

0

Pleuraflüssigkeiten von Tumor- oder HIV-Patienten werden zur  
Gewinnung antigenpräsentierender Zellen verwendet.

5

-11-

- 1 Die Pleuraflüssigkeit wird zentrifugiert und der erhaltene  
Zellniederschlag mit modifizierter Hanks Lösung gewaschen,  
zentrifugiert und zu 3 ml Aliquots abgefüllt.
- 5 Die präparierten Zellen (Aliquots) werden im Medium M 199,  
das mit 2%igem hitzeinaktivierten fötalen Kälberserum und  
100 µl Fluoreszenzfarbstoff (von Beispiel 1) ergänzt ist,  
resuspendiert und dann in Kulturflaschen überführt und 24 h  
10 kultiviert. Danach werden nicht-adhärenente Zellen  
ausgewaschen und festsitzende markierte Zellen mit 0,25 M  
EDTA, pH - 7,5 behandelt, um kontaminierende Fibroblasten,  
Makrophagen und Mesothelzellen zu entfernen.
- 15 Spezifische Zellen werden dann in serumfreies,  
antigenstimulierendes Medium überführt. Es handelt sich um  
das Basismedium - IMDM (Iscoves modified Dulbecco medium),  
ohne L-Glutamin, das mit Faktoren wie 1 U/ml TCGF,  
0.1 µl/ml GM-CSF und 10 µl/ml Fluoreszenzfarbstoff (von  
Beispiel 1) ergänzt wird. Die erhaltenen  
20 fluoreszenzmarkierten Klone werden in 100 µl Aliquots in  
flüssigem Stickstoff eingelagert.

#### Beispiel 4

- 25 Isolierung und Aufbereitung humaner T<sub>H</sub>-Zellvorläufer und  
B-Zell-Vorläufer.
- 30 T<sub>H</sub>-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer werden nach dem  
bekannten "buffy coat"-Verfahren aus heparinisiertem  
Venenblut von virusinfizierten oder tumorinfiltrierten  
Personen mit handelsüblichen Zentrifugationsmedien isoliert,  
gewaschen und in mit humanen A und B Blutgruppenserum  
beschichteten Petrischalen 6 h in feuchter Kammer bei 37°C  
35 inkubiert. Die Petrischalen waren zusätzlich mit GM - CSF  
(100 µl 1:10 und 100 µl 1:500)

- 1 beschichtet, wobei das Volumen dem der Verwendung von  
Blutgruppenserum entsprach.

- 5 Nicht adhärenzte Zellen werden ausgewaschen und die  
festsitzenden Zellen bis zur Wiederverwendung in  
serumfreiem, antigenstimulierenden Medium (siehe Beispiel 3)  
resuspendiert und im Kühlschrank aufbewahrt.

10 Beispiel 5

Isolierung und Aufbereitung humaner B-Zellen.

- 15 B-Zellen von HIV-infizierten oder tumorinfiltrierten  
Personen werden nach dem bekannten  
Ficoll-Hypaque-Gradientenzentrifugations-Verfahren isoliert,  
gewaschen und 1 h bei 37°C unter Zugabe von 100 µl  
Fluoreszenzfarbstoff von Beispiel 1 in serumfreiem,  
nicht-antigenstimulierenden Medium inkubiert. Es handelt  
20 sich um das Basismedium-IMDM (Iscoves modified Dulbecco  
medium), ohne L-Glutamin, dem Faktoren wie 1 U/ml  
LAF, 1 µl/ml TRF, 0,1 µl/ml GM-CSF und 10 µl/ml  
Fluoreszenzfarbstoff (von Beispiel 1) zugegeben werden.  
Anschließend wird 5 min bei 500 g zentrifugiert.

- 25 Der Zellschlag wird im Medium resuspendiert und die  
Zellsuspension wird dann auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt  
und aufbewahrt. Bei 9 - 20 % Fluoreszenzfarbstoff im Medium  
werden Zellzahlen von  $4.85 \times 10^6$  bis  $5.36 \times 10^6$  Zellen  
30 erreicht. Farbstoffkonzentrationen unterhalb von 50 % haben  
keinen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen.

Beispiel 6

- 35 Anbindung humaner antigenpräsentierender Zellen an humane  
 $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer.

-13-

1 100  $\mu$ l fluoreszenzmarkierte antigenpräsentierende Zellen  
werden mit 100  $\mu$ l  $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer  
gemischt und 60 min bei 37°C und 5 %  $CO_2$  inkubiert. Danach  
werden nicht-adhärenente Zellen ausgewaschen. Die  
5 festsitzenden Zellen werden in serumfreies, nicht-  
antigenstimulierendes Medium (siehe Beispiel 5) überführt,  
90 min bei 40°C inkubiert und dann zentrifugiert. Unter  
kurzer Einwirkung von UV-Licht und Luftdruckschwankungen  
lösen sich die antigenpräsentierenden Zellen vollständig von  
10 den antigenaktivierten  $T_H$ -Zellvorläufern und  
B-Zellvorläufern ab.

Nach einer Zentrifugation werden die antigenaktivierten  
Zellvorläufer in serumfreiem, antigenstimulierendem Medium  
15 (siehe Beispiel 3) resuspendiert und bis zu ihrem Gebrauch  
aufbewahrt.

#### Beispiel 7

20

Anbindung antigenaktivierter humaner  $T_H$ -Zellvorläufer- und  
B-Zellvorläufer an humane B-Zellen

B-Zellen werden, wie in Beispiel 5 beschrieben, vorbehandelt.  
25 50  $\mu$ l fluoreszenzmarkierte, antigenaktivierte  
 $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer werden mit 50  $\mu$ l  
vorbehandelte B-Zellen vorsichtig gemischt und 60 min bei  
37°C und 5 %  $CO_2$  inkubiert. Nichthaftende Zellen werden  
mit serumfreiem, nicht-antigenstimulierendem Medium (siehe  
30 Beispiel 5) ausgewaschen. Adhärenente Zellen werden in  
serumfreiem, nicht-antigenstimulierendem Medium 90 min

35

1 bei 40°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend findet eine  
kurze Einwirkung von UV-Licht (360-420 nm) und ein  
Druckabfall statt. Die antigenaktivierten T<sub>H</sub>-Zellvorläufer  
und B-Zellvorläufer werden vollständig von den B-Zellen  
5 abgelöst. Aus dem Überstand werden die antigenaktivierten  
T<sub>H</sub>-Zellvorläufer und B-Zellvorläufer abzentrifugiert.  
Nachdem ferner Makrophagen und restliche Zellvorläufer  
entfernt sind, werden die B-Zellen nochmals mit 100 µl des  
Fluoreszenzfarbstoffes (von Beispiel 1) markiert, dann  
10 aliquotiert und bei -20°C bis zu ihrem Gebrauch eingelagert  
oder in Tüpfel von Mikrotiterplatten (1x10<sup>9</sup> Zellen/ml und  
2x10<sup>9</sup> Zellen/ml) überführt und 8 Tage bei 37°C und 5 %  
CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle zwei Tage wird die Antikörperbildung  
überprüft.

15 Nach Stimulation durch Freßzellen oder Makrophagen  
proliferieren die B-Zellen und differenzieren als Klone zu  
antikörpersezernierenden Plasmazellen aus.

20

#### Beispiel 8

#### Klonierung der antikörpersezernierenden Plasmazellen

25 Alle Tüpfel mit positivem Überstand werden gesammelt. Je  
nach Wahl werden 10<sup>8</sup> Freßzellen/ml oder 4x10<sup>6</sup>  
Makrophagen/ml in die Tüpfel der Mikrotiterplatten  
eingebracht. Die im positiven Überstand vorliegenden Zellen  
werden gezählt. Für die Klonierung sind 10<sup>3</sup> Zellen  
30 ausreichend.

35

- 1 30 Zellen werden in 1 ml Medium von Beispiel 7 suspendiert  
und dann in 0,1 ml Aliquots ausplattiert. Die restlichen  
Zellen werden auf 10 Zellen/ml und dann so weiter bis 3  
Zellen/ml eingestellt. Alle in Tüpfeln verteilten Zellen  
5 werden bei 37°C in feuchter Kammer inkubiert.

#### Aufbereitung von humanen Preßzellen und Makrophagen.

- 20 ml Frischblut werden mit serumfreiem,  
10 nicht-antigenstimulierenden Medium (siehe Beispiel 5)  
verdünnt und nach bekannten Verfahren mit Ficoll 15 min bei  
500 g zentrifugiert. Rote Blutzellen und Polymorphe befinden  
sich dann am Röhrchenboden. Periphere einkernige Blutzellen,  
so auch Monozyten liegen in der Zwischenphase. Diese Phase  
15 wird vorsichtig abgesaugt und mit demselben Volumen an dem  
Medium von Beispiel 5 versetzt und 5 min bei 500 g  
zentrifugiert. Der Zellschlag wird dann im Medium  
resuspendiert, gezählt und auf  $3 \times 10^7$  Zellen/ml  
eingestellt. Das Gesamtvolumen sollte 10 ml nicht  
20 überschreiten. Diesem wird 1 ml Fluoreszenzfarbstoff von  
Beispiel 1 zugegeben. Die Zellen werden dann mit Medium  
verdünnt und mit  $5 \times 10^4$  Zellen/Tüpfel ausplattiert.

#### 25 Beispiel 9

Aktivitätstest von erfindungsgemäß hergestellten  
HIV-Antikörpern gp 120/160.

- 30 Seren von 5 seropositiven/viruspositiven Patienten, 5  
seropositiven/virusnegativen Patienten und 5 Normalpersonen  
werden isoliert und aufbereitet.

- 1 Jeweils 200  $\mu$ l aus diesen 15 Humanseren werden in je 3  
Reihen einer mit HIV-Antigen beschichteten kommerziellen  
Mikrotiterplatte pipettiert und 1 h bei RT inkubiert und  
dann gewaschen. Jeweils 50  $\mu$ l unverdünnter, 1:100  
5 verdünnter, 1:500 verdünnter und 1:1000 verdünnter  
fluoreszenzmarkierter HIV-Antikörper gp 120/160 werden  
zugegeben, bevor 1 h bei RT inkubiert und dann gewaschen  
wird. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Blockierungslösung  
(Sterilmolke) wird die Mikrotiterplatte 15 min  
10 stehengelassen, dann gewaschen und gemessen.

Auswertung:

- Für die Auswertung von Ergebnissen im unteren Normalbereich  
bieten sich folgende Auswertungen an:  
15 Regressionsmethode - einfach linear und die gerichtete  
lineare Regression,  
Splitte Interpolation und polygonale Interpolation.

Gerät-Enzymreader Behringwerke, 410 nm.

20

Berechnungsbeispiel: negative Kontrolle 0.050  
positive Kontrolle 0.600  
 $(0.050 + 0.600/2) = 0.325$

- 25 Absorptionsratio: weniger als 2,5 negativ  
zwischen 2.5-5 Annahme von HIV-AK  
bis low-level  
größer als 5-11 high level

- 30 Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Mittelwert der 5 Seren der Normalpersonen: 0.058  
Mittelwert der 5 seropositiven/viruspositiven Seren: 2.7  
Mittelwert der 5 seropositiven/virusnegativen Seren: 1.85

35

1     Beispiel 10

## Immuncytochemischer Assay

5     Zellen werden mit einem nicht markierten Antikörper reaktiviert, gewaschen, in chamber slides transferiert und auf dünn aufgetragenes Medium (von Beispiel 3) angesetzt und fixiert. Die zu untersuchenden Zellen werden mit 50 µg/ml L-Lysin oder mit carriergebundenem Fluoreszenzfarbstoff (von 10     Beispiel 2) vorbehandelt. Ein Überschuß der L-Lysin Bindungskapazität wird nach 10 Minuten mit 1 bis 2 Tropfen (25 µl bis 50 µl) Blockierungslösung (sterile Molke) verhindert. Anschließend werden die Zellen mit Medium gewaschen, eine Stunde in feuchter Kammer mit einem 15     erfindungsgemäß fluoreszenzmarkierten Antikörper oder mit einem nach üblichen Verfahren markierten Antikörper bei RT oder 37°C inkubiert (die Inkubationstemperatur hängt von der Art des Antikörpers ab), danach wieder mit Medium gewaschen und unter dem Mikroskop in den chamber slides untersucht.

20

Beispiel 11

## Direkte und indirekte Membran-Immunfluoreszenz

25

Mit den Verfahren der direkten und indirekten Membran-Immunfluoreszenz kann Biopsie-Material, insbesondere Lymphknoten, sofort untersucht werden.

30     Für das direkte Test-Verfahren werden frische humane Lymphknoten mit einem Tropfen eines erfindungsgemäß fluoreszenzmarkierten und zusätzlich komplementverstärkten humanen monoklonalen Antikörpers beschickt, 10 Minuten inkubiert und mit physiologischer, steriler Kochsalzlösung 35     gewaschen.

- 1 Beim indirekten Test-Verfahren werden erfindungsgemäß  
hergestellte, jedoch keine Fluoreszenz aufweisende,  
komplementverstärkte, humane monoklonale Antikörper mit  
fluoreszenzmarkiertem Anti-Ig sichtbar gemacht.

5

10

15

20

25

30

35

1

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von humanen monoklonalen  
Antikörpern, gekennzeichnet durch folgende  
5 Verfahrensschritte:
- a) Isolierung und Aufbereitung von antigenpräsentierenden  
Zellen,  $T_H$ -Zellvorläufern und B-Zellvorläufern aus  
tumorinfiltrierten, mit prokaryontischen oder  
10 eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren, infizierten  
oder eine erbliche Krankheit aufweisenden Personen,
- b) Aktivierung der  $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer  
von a) durch Anbindung an die antigenpräsentierenden  
15 Zellen von a),
- c) Isolierung und Aufbereitung von B-Zellen aus  
tumorinfiltrierten, mit prokaryontischen oder  
eukaryontischen Erregern, insbesondere Viren,  
20 infizierten, eine erbliche Krankheit aufweisenden oder  
gesunden Personen,
- d) Aktivierung der B-Zellen von c) durch Anbindung an die  
antigenaktivierten  $T_H$ -Zellvorläufer und B-Zellvorläufer  
25 von b), und
- e) Klonierung der aktivierten B-Zellen von d).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  
30 die antigenpräsentierenden Zellen aus der  
Pleuraflüssigkeit und die  $T_H$ -Zellvorläufer,  
B-Zellvorläufer und B-Zellen aus Venenblut isoliert  
werden.

35

- 1      3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,  
daß die Aufbereitung der isolierten  
antigenpräsentierenden Zellen und der isolierten B-Zellen  
eine Proliferations-Stimulierung der Zellen umfaßt.
- 5
4. Verwendung der nach dem Verfahren von Anspruch 1  
hergestellten humanen monoklonalen Antikörpern zur  
Diagnose bei Tumor-, erblichen oder durch prokaryontische  
oder eukaryontische Erreger, insbesondere Viren,  
10 verursachten Erkrankungen.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT /EP 90/00976

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. 5      C 12 N 5/24, A 61 K 39/395		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl.5	C 12 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	Journal of Immunological Methods, Vol. 100, 1987. Keith James et al.: "Human monoclonal antibody production Current status and future prospects", see page 5 - page 40 see page 30.	1-4
Y	Patent Abstracts of Japan, Vol.12,N°5,C467 abstract of JP 62-163686, pub. 20.07.1987 MITSUBISHI CHEM IND LTD ET AL.	2
Y	TIBTECH, Vol., June 1986 Carl A.K.Borre- baek: "In vitro immunization for production of murine and human mono- clonal antibodies: present status", see page 147-page 153 see the whole document	1,3,4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>14</sup> Special categories of cited documents: <sup>15</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search 28 September 1990 (28.09.90)		Date of Mailing of this International Search Report 9 October 1990 (09.10.90)
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE		Signature of Authorized Officer

## II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Character of Document, with abstract, where appropriate, or the relevant part thereof	Relevant to Claim No.
A	US,A,4444887 (MICHAEL K.HOFFMAN) 24 April 1984 see claims	1
A	WO,A1, 8905308 (GESELLSCHAFT FÜR) BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH) 15 June 1989. see the whole document.	1
A	EP,A2, 0118893(SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 19 September 1984, see the whole document.	1
A	WO,A1, 8807077 (THE CHILDREN'S HOSPITAL, INCORPORATED) 22 September 1988 see the whole document.	1,3
	----- -----	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.PCT/EP 90/00976**

SA 38039

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 29/08/90  
The European Patent office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 4444887	24/04/84	NONE	
WO-A1- 8905308	15/06/89	DE-A- 3827145 EP-A- 0321749	15/06/89 28/06/89
EP-A2- 0118893	19/09/84	CA-A- 1242158 JP-A- 60012973 US-A- 4693966	20/09/88 23/01/85 15/09/87
WO-A1- 8807077	22/09/88	AU-D- 1363088 EP-A- 0348413	10/10/88 03/01/90

For more details about this annex : see Official Journal of the European patent Office, No. 12/82

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 90/00976

<b>I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGSGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) <sup>1</sup>		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC InLCl.5 C 12 N 5/24, A 61 K 39/395		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierte Mindestprüfstoff <sup>2</sup>		
Klassifikationssystem InLCl.5	Klassifikationsymbole C 12 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>3</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>4</sup></b>		
Art <sup>5</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
Y	Journal of Immunological Methods, Band. 100, 1987 Keith James et al.: "Human monoclonal antibody production Current status and future prospects", siehe Seite 5 - Seite 40 siehe Seite 30 --	1-4
Y	Patent Abstracts of Japan, Band 12, Nr 5, C467, Zusammenfassung von JP 62-163686, publ 1987-07-20 MITSUBISHI CHEM IND LTD ET AL. --	2
Y	TIBTECH, Band., Juni 1986 Carl A.K. Borrebaeck: "In vitro immunization for production of murine and human monoclonal antibodies: present status", siehe Seite 147 - Seite 153 Insgesamt --	1,3,4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"Z" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung befragt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 28. September 1990		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 09.06.1990
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt		Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten MISS D. S. K. WALEZYK

III EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		Betr. Anspruch Nr.
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	
A	US, A, 4444887 (MICHAEL A. HOFFMANN) 24 April 1984, Siehe Ansprüche --	1
A	WO, A1, 8905308 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH) 15 Juni 1989, siehe Dokument insgesamt --	1
A	EP, A2, 0118893 (SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 19 September 1984, siehe Dokument insgesamt --	1
A	WO, A1, 8807077 (THE CHILDREN'S HOSPITAL, INCORPORATED) 22 September 1988, siehe Dokument insgesamt -- -----	1,3

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.PCT/EP 90/00976**

SA 38039

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht eingeführten Patentedokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 29/08/90.  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht eingeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A- 4444887	24/04/84	KEINE	
WO-A1- 8905308	15/06/89	DE-A- 3827145 EP-A- 0321749	15/06/89 28/06/89
EP-A2- 0118893	19/09/84	CA-A- 1242158 JP-A- 60012973 US-A- 4693966	20/09/88 23/01/85 15/09/87
WO-A1- 8807077	22/09/88	AU-D- 1363088 EP-A- 0348413	10/10/88 03/01/90

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82